

*Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. Dr. G. Bodechtel*

Über die Beeinflußbarkeit der Aldolase durch einige chinoide Substanzen

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Ardishir Shahbandari

aus

Jazd / Iran



München 1959

5349/60

*Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München*

Referent: Prof. Dr. Dr. K. Dirr

Dekan: Prof. Dr. H. Schwiegk

Tag der mündlichen Prüfung:

15. Mrz 1960

S.A.,- " Arzneimittel-Forschung "
9.Jg.1959, 11 S. 660-662

Der Aldolase-Gehalt des Serums ist zu einem bewährten Kriterium der klinischen Diagnostik für das Vorhandensein verschiedener Krankheiten geworden, zu denen auch das Carcinom zählt. Da viele der modernen Cytostatika Chinon-Derivate sind bzw. enthalten, wurde der Einfluß verschiedener Chinon-Derivate auf die Aldolase untersucht.

Nach D. Burk [1] beruht die cytostatische Wirksamkeit aller Chemotherapeutica auf ihrem hemmenden Einfluß auf die Glykolyse, welche Reaktionsfolge nach O. Warburg [2] bei krebsig entarteten Zellen stets gesteigert abläuft. H. Holzer [3, 4] wies z. B. nach, daß die Wirkung des von den Bayer-Werken entwickelten chinoiden Therapeuticums E 59[®] (2,5-Bis-n-propoxy-3,6-bis-äthyl-imino-benzochinon-(1,4)) auf der Blockierung des oxydierenden Ferments der Gärung und einer Verminderung der Konzentration des oxydierten Diphosphopyridinnukleotids in der Zelle beruht. Die Wirkung der chinoiden [5, 6, 3] und anderer Chemotherapeutica [5, 7, 8] läßt sich weitgehend durch die Hemmung dieser Enzymsysteme erklären. Trotzdem untersuchten wir den Einfluß von Chinon-Derivaten auf die Aldolase, die Desmolase der Glykolyse, denn es konnte bisher nicht ausgeschlossen werden, daß die Chemotherapeutica nur die erstgenannten Enzyme beeinflussen. Außerdem ist in der Literatur ein Fall beschrieben [9], bei dem ein Chinon-Derivat die Aktivität einer, allerdings pflanzlichen, Aldolase beeinflusst hat.

Das Ferment Aldolase ist die Desmolase der Embden-Meyerhof-Reaktionsfolge, also ein Enzym, das eine C-C-Bindung zu spalten vermag. Die klassische Embden-Meyerhof-Aldolase, die vornehmlich im Muskel, in der Leber und im Blut, da vor allem in den Erythrocyten vorkommt, katalysiert folgende Reaktion: Fruktose-1,6-diphosphorsäure $\rightleftharpoons$ 3-Phosphoglycerinaldehyd + Dioxyacetonphosphat [10, 11, 12].

Außer dieser klassischen Aldolase sind noch einige andere Aldolasen in tierischen und pflanzlichen Ge-



weben, vor allem in der Hefe, nachgewiesen worden [13—25], die jedoch andere Substrate, einen mehr oder weniger engen Spezifitätsbereich, verschiedene Wirkungsoptima und unterschiedliche Hemmbarkeit besitzen. Wir verwendeten zu unseren Versuchen nur die klassische Aldolase.

Kristallisierte Aldolase wird in ihrer Aktivität nicht durch Metallionen beeinflusst [26]. Andererseits ist nach Cori u. a. [27, 28] die Muskelaldolase durch Cu^{2+} und Ag^{1+} hemmbar, jedoch nicht durch Komplexbildner, da sie ohne Metallionen wirkt. Die Hefealdolase wird durch Fe^{2+} und Zn^{2+} sowie Co^{2+} -Ionen aktiviert und entsprechend durch Komplexbildner gehemmt. Sie wird außerdem durch Cyanid, Pyrophosphat und Cystein gehemmt, im Gegensatz zur Aldolase der Warmblüter. Nach W. Dirscherl et al. [29] ist die Aldolase durch Steroidhormone beeinflussbar, was Baker u. Govan [30] besonders im Serum-Aldolase-spiegel von Patienten mit Prostatacarcinom verfolgten. Flaig [9] berichtet, daß das Thymohydrochinon die Aldolase beeinflusst.

Die Wirkung von Hydrochinonen, Chinonen und Naphthochinonen auf die Aktivität verschiedener pflanzlicher und tierischer Dehydrogenasen ist schon seit längerer Zeit bekannt [9, 31, 32, 33]. So beobachteten Bergstermann u. Stein [34] und andere Autoren [35, 36] eine starke Hemmung der Bernsteinsäuredehydrase durch p-Benzochinon. Nach Hofmann-Ostenhof [37] und R. Kuhn [38] sollen diese Substanzen wie die Jodessigsäure vorwiegend auf die in diesen Enzymen vorkommenden Sulfhydryl-Gruppen einwirken, die entweder oxydiert oder durch Gruppensubstitution blockiert werden und so die Enzymaktivität hemmen. Diese Vorstellung wurde auch von Holzer u. Sedlmeyer für E 39 im Falle des SH-Enzyms der Gärung geäußert [3]. Ein hiervon abweichender Mechanismus der Enzymhemmung durch Chinone wurde von A. Herz [39] beschrieben. Danach soll das Chinon als H-Acceptor und -Überträger mit den Dehydrasen reagieren und auf diese Weise den Pyridinnukleotid-Haushalt der Zelle stören. Hierfür würde auch der schon erwähnte Befund von H. Holzer [3, 4] sprechen und müßte als unspezifische Chinonoxydase-Wirkung der betreffenden Enzyme gedeutet werden.

Über die Beeinflussung anderer Enzyme durch Chinone, die nicht zur Klasse der Dehydrasen gehören, ist in der Literatur nur wenig zu finden. U. a. hat Flaig [9] den Einfluß des Thymohydrochinons auf die Aktivität der Aldolase aus Roggen untersucht.

Soweit sich die Wirkungsweise der bekanntesten Cytostatica schon überblicken läßt, beruht sie meist auf einem der vorausgehenden Hemmungsmechanismen der Glykolyse [1, 40]. Dies gilt im Besonderen für das schon erwähnte Präparat E 59 [3, 6], für Aethylenchinone [5], Aethylenimine [5, 7] und N-Lost [7, 8]. Für letzteres wurde auch eine schädigende Wirkung auf die Hexokinase [41] sowie auf die Phosphohexokinase [42] erwähnt. Ähnliches dürfte für die Wirkungsweise der Vitamine A und C in hohen Dosen beim Carcinom gelten [42]. Besonders im Falle des Vitamins C kennt man die entscheidende Stellung der Dehydroascorbinsäure im Stoffwechsel der Aminosäuren, deren geregelter Haushalt Voraussetzung für normales Wachstum ist [44]. Auch die Wirkung des Wasserstoffsuperoxyds als Krebsheilmittel [45] kann heute durch die Theorie Warburgs [2] als erklärbar angesehen werden. Bei all diesen mehr oder weniger bewährten Krebsheilmitteln spielt das Redoxpotential eine Rolle.

Versuche

Zur Bestimmung der Aldolase schied die Methode nach Warburg u. Christian [46], die auf dem Prinzip des kombinierten optischen Tests beruht und den Vorzug großer Exaktheit und Einfachheit hat, aus, weil die Chinon-Derivate von dem hier verwendeten reduzierten Diphosphopyridinnucleotid (DPNH) reduziert werden und mit Proteinen eine Verbindung eingehen, die bei der Wellenlänge 366 m μ absorbiert, was den Test unmöglich macht. Deshalb wurden die Aldolase-Aktivitäten nach der Methode von Bruns [47] ermittelt. Ihr Prinzip beruht auf der Messung der Spaltprodukte des Substrats: Fructose-1,6-diphosphat wird in 3-Glycerinaldehydphosphat und Dioxyacetonphosphat gespalten. Die beiden zu gleichen Teilen anfallenden Spaltprodukte werden von Hydrazin abgefangen. Nach Unterbrechung der Reaktion mittels Trichloressigsäure und kurzer alkalischer Hydrolyse zur Abspaltung des Phosphats der Triosen werden diese mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin umgesetzt. Die sich bei alkalischer Reaktion bildende Farbe der Phenylhydrazone (Absorptionsmaximum bei 540 m μ) ist proportional der Menge der entstandenen Triosen und damit ein Maß für die in der Zeiteinheit gespaltenen Fructosediphosphorsäure und demnach für die Aldolase-Aktivität.

Bei den Testen wurde Serumaldolase und kristallisierte Aldolase*) verwendet.

Der Einfluß des Vitamins C und folgender Chinon-Derivate auf die Aldolase-Aktivität wurde geprüft: p-Benzochinon, p-Benzohydrochinon, Natrium- β -Naphthochinonsulfat, α -Naphthochinon und Vitamin K.

Zum Bestimmungsansatz nach Bruns [47] wurde jeweils der zu prüfende Stoff in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Die gemessene Aktivität wurde in Prozent der ungehemmten Aktivität (= 100%) angegeben. Dieses Vorgehen, die Aktivität in Prozenten und nicht in absoluten Werten anzugeben, erwies sich als günstig, da die Alterung des Enzyms mit einer Aktivitätszunahme verbunden war, was schon lange bekannt ist [10].

*) Die Aldolase stammte von der Firma C. F. Boehringer & Soehne, GmbH, Mannheim, desgleichen waren sämtliche, zur Anwendung gekommene Substrate, Puffer, Analysensubstanzen usw. Präparate dieser Firma.

Im Versuchsansatz waren enthalten: 1,0 ml einer ca 8%igen Eiweißlösung, 1,75 ml Collidin-Puffer vom pH 7,4 (0,075 m), 0,25 ml Fruktosediphosphat-Lösung (0,10 m) und 0,001–0,1 ml Hemmstofflösung entsprechend den Endkonzentrationen 10^{-5} bis 10^{-7} molar. Der Ansatz wurde auf 3,5 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt. Jeder Enzym-Hemmversuch wurde mit menschlichem Mischserum als Eiweiß-Lösung und Aldolasequelle oder mit einer 8%igen Lösung von Rinderalbumin in doppelt destilliertem Wasser und Zusatz von 1,78 ml Aldolase-Suspension (Org. Boehringer) in gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung vorgenommen. Als Collidin-Puffer diente das Puffergemisch Boehringer 15 420, das 100 ml wäßriger 0,1 m Collidin-Lösung, 25 ml 0,56 m Hydrazin-Lösung, 25 ml 0,002 m Na-Monojodazetat-Lösung und 25 ml Aqua bidest. enthält.

Im Leerwert (Aktivität = 100%) wurde an Stelle der Hemmstoff-Lösung 0,1 ml Aqua bidest. zugesetzt.

Ergebnisse und Diskussion

Bei den so durchgeführten Experimenten zeigte sich in Gegenwart von α -(o)-Naphthochinon, Vitamin C und Vitamin K keine Beeinflussung der Enzym-Aktivität der Aldolase, weder in hemmendem noch in aktivierendem Sinne. Dagegen wurde mit den folgenden Substanzen eine der Konzentration des Hemmstoffes proportionale Hemmung der Aldolase-Aktivität erzielt: p-Benzochinon, p-Hydrochinon und Natrium- β -(o)-naphthochinonsulfat, wie sie aus den Figuren 1 bis 3, die mit kristallisierter Aldolase erhalten wurden, ersichtlich ist. Die Quelle der Aldolase spielte bei der Beeinflußbarkeit keine Rolle. Es ergab sich hinsichtlich der Hemmung kein Unterschied zwischen der Serum-Aldolase und der kristallisierten Aldolase. Der Verlauf der Kurven 1 und 2 zeigt, daß es sich beim p-Benzochinon und p-Hydrochinon um eine der Hemmstoffkonzentration direkt proportionale Hemmung handelt. Dagegen scheint beim Natrium- β -(o)-naphthochinonsulfat (Fig. 3) ein hiervon abweichender Mechanismus vorzuliegen, so daß sich bei halblogarithmischer Darstellung eine Gerade ergibt.

Die Versuchsergebnisse waren überraschend, da sowohl das p-Benzochinon als auch das p-Benzohydrochinon eine Hemmung des Aldolasesystems hervorbrachten; es ist nicht leicht, hier einen Zusammenhang zwischen der Struktur des Hemmstoffes und der Hemmwirkung herzustellen. Das Oxydationsvermögen des Chinons, bzw. Reduktionsvermögen des Hydrochinons kann nach diesen Ergebnissen nicht für die Wirkung verantwortlich gemacht werden. Es muß offen bleiben, welchem Strukturelement die Wirkung zugeschrieben werden kann. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine der Substanzen in die andere übergeführt wird, was mit chemischen oder elektrochemischen Methoden nachweisbar wäre, aber nicht im Rahmen dieser Arbeit lag.

Das α -(p)-Naphthochinon oder 1,4-Naphthochinon und der Grundring des Vitamins K, das ein Derivat

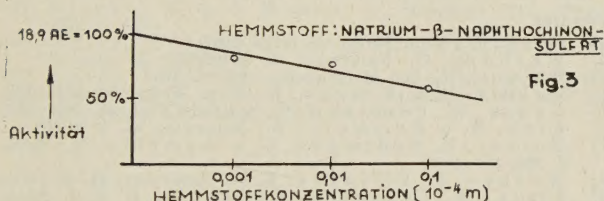
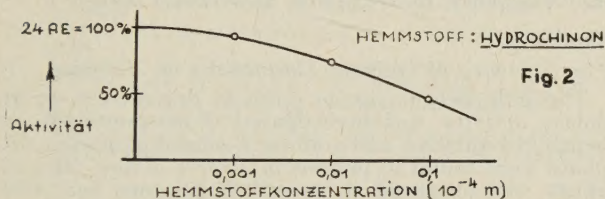
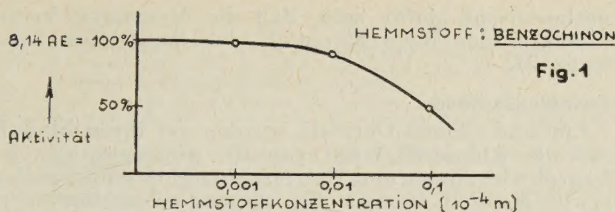


Fig. 1—3: Hemmung der Aldolase-Aktivität durch Chinon-Derivate

des 1,4-Naphthochinons ist, zeigen chemisch große Ähnlichkeit mit dem p-Benzochinon. Deshalb ist es verwunderlich, daß 1,4-Naphthochinon und Vitamin K nicht dieselbe Wirkung wie p-Benzochinon und p-Hydrochinon verursachen.

Im Gegensatz dazu unterscheidet sich u. a. das β -(o)-Naphthochinon von der p-Verbindung dadurch, daß es nicht mit Wasserdämpfen flüchtig ist und sein Oxydationsvermögen geringer ist als das der Benzoquinone und des α -Naphthochinons. Trotzdem wirkte die einzige o-chinoide Substanz, die untersucht wurde, das Natrium- β -(o)-naphthochinonsulfat, im Sinne von p-Benzochinon und p-Hydrochinon. Es sei jedoch erwähnt, daß es sich um eine Reaktion der Sulfatsubstituierung handeln könnte, die zum Zwecke der besseren Löslichkeit in Wasser vorgenommen werden mußte.

Die Ascorbinsäure wurde als Modell einer Enol-Verbindung mit Reduktionsvermögen als Hemmstoff für die Aldolase untersucht. Ihre Unwirksamkeit kann

mitbeweisend dafür sein, daß die Hemmung keine Funktion des Redoxpotentials der zugefügten Substanz ist.

Zusammenfassung

Einfache Chinon-Derivate wurden auf ihren Einfluß auf die Aldose-Aktivität geprüft. p-Benzochinon, p-Benzohydrochinon und Natrium- β -naphthochinonsulfat erwiesen sich als Hemmstoffe, während α -Naphthochinon und Vitamin K diesbezüglich unwirksam waren.

Summary

The Influence of Quinone Derivatives on Aldolase

The influence of simple quinone derivatives on aldolase activity was investigated. P-benzoquinone, p-benzhydroquinone and sodium β -naphthoquinone sulphate were found to possess inhibitive action. No such effect was observed in α -naphthoquinone and vitamin K.

Literatur

- [1] Burk, D., Klin. Wschr. **35**, 1102 (1957)
- [2] Warburg, O., Naturwiss. **46**, 25 (1959)
- [3] Holzer, H., Die Medizinische 1956, S. 576
- [4] Holzer, H. u. Kröger, H., Klin. Wschr. **36**, 677 (1958)
- [5] Gauss, W., Petersen, S., Angew. Chem. **69**, 252 (1957)
- [6] Rick, W. u. Remmele, W., Naturwiss. **44**, 67 (1957)
- [7] Holzer, H., Sedlmayr, G. u. Kemnitz, A., Bioch. Z. **328**, 163 (1956)
- [8] Woerber, K., Eifinger, F. F., Naturwiss. **44**, 67 (1957)
- [9] Flaig, W., Scharrer, K., Scholl, G. Z. f. Pflanzenernährung und Düngung **76**, 201 (1957)
- [10] Meyerhof, O. u. Lohmann, K., Bioch. Z. **271**, 89 (1954)
- [11] Meyerhof, O. u. Lohmann, K., Bioch. Z. **273**, 73 (1954)
- [12] Meyerhof, O. u. Lohmann, K., Bioch. Z. **273**, 415 (1954)
- [13] Kaletta-Gmünder, U., Wolf, H. P. u. Leuthardt, F., Helv. Chim. Acta **40**, 1027 (1957)
- [14] Leuthardt, F., 8. Coll. d. Ges. f. Physiol. Chem. in Mosbach/Baden 1957. Verlag Springer, Berlin, 1958, S. 1
- [15] Wolf, H. P. u. Leuthardt, F., Helv. Chim. Acta **40**, 1033 (1957)
- [16] Cardini, C. E., Enzymologia **15**, 303 (1952)
- [17] Forrest, R. S., Hough, L. a. Jones, J. K. N., Chemistry and Industry 1951, S. 1093
- [18] Glock, G. E., Biochem. J. **52**, 575 (1952)
- [19] McGeown, M. G. a. Malpress, F. H., Nature (London) **173**, 212 (1954)
- [20] Charalampous, F. C. a. Mueller, G. C., J. Biol. Chem. **201**, 161 (1953)
- [21] Dickens, F. a. Glock, G. E., Biochem. J. **50**, 81 (1951)
- [22] Marmur, J. a. Schlenk, F., Arch. of Bioch. a. Biophys. **51**, 154 (1951)
- [23] Waldvogel, M. J. a. Schlenk, F., Arch. of Biochem. **14**, 484 (1947)
- [24] Racker, E., Nature (London) **167**, 408 (1951)
- [25] Horecker, B. L., 8. Coll. d. Ges. f. Physiol. Chemie in Mosbach/Baden 1957. Verlag Springer, Berlin, 1958, S. 29
- [26] Warburg, O. u. Christian, W., Biochem. Z. **314**, 149 (1945)
- [27] Taylor, J. F., Green, A. A. a. Cori, G. T., J. Biol. Chem. **173**, 591 (1948)

- [28] Beisenherz, G. u. Boltze, J. H., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E. u. Pfleiderer, G., Z. f. Naturforsch. **8b**, 555 (1953)
- [29] Dirscherl, W. u. Schriefers, H., Z. f. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **7**, 97 (1955)
- [30] Baker, R. a. Govan, D., Cancer Res. **13**, 141 (1953)
- [31] Wieland, H., Lawson, A., Liebigs Ann. d. Chem. **485**, 193 (1932)
- [32] Wieland, H. u. Claren, O. B., Liebigs Ann. d. Chem. **509**, 182 (1934)
- [33] Ball, E. Y., Anfinsen, C. B. u. Cooper, O., J. Biol. Chem. **168**, 237 (1947)
- [34] Bergstermann, H. u. Stein, W., Biochem. Z. **317**, 217 (1944)
- [35] Potter, V. R. u. Dubois, K. P., J. Gen. Physiol. **26**, 391 (1942)
- [36] Barron, E. S. G., J. Biol. Chem. **113**, 695 (1936)
- [37] Hoffmann-Ostenhof, O., Experientia **3**, 176 (1947)
- [38] Kuhn, R. u. Hammer, J., Chem. Ber. **84**, 91 (1951)
- [39] Herz, A., Biochem. Z. **325**, 83 (1954)
- [40] Quastel, J. H., Enzymes: Units of Biological Structure and Function. (Gaebler, O. H., Ford, E. B., Acad. Press, May 1956)
- [41] Needham, D. M., Proc. of the Biochem. Society XXV in Biochem. J. **42** (1948)
- [42] Gilman, A. u. Philips, F. S., Science **103**, 409 (1946)
- [43] Kleine, H. O. u. Huber, L., Münchner Med. Wschr. **1954**, S. 367
- [44] Heise, E., Lührs, W. u. Neunhoeffer, O., Naturwiss. **44**, 425 (1957)
- [45] Goldschmidt, S. u. Jutz, C., Chem. Ber. **89**, 518 (1956)
- [46] Warburg, O. u. Christian, W., Biochem. Z. **314**, 399 (1943)
- [47] Bruns, F., Biochem. Z. **325**, 156 (1954)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555211_0015

Lebenslauf

Ich „Ardishir Sh a h b a n d a r i“ wurde am 23. 12. 1925 als Sohn des Kaufmanns „Hormozd Sh a h b a n d a r i“ in Jazd, Iran, geboren. Ich besuchte 6 Jahre die dortige Volksschule „Markar“. Nach Verlassen der Volksschule trat ich in das Gymnasium „Iranshar“ über, das ich im Jahre 1944 mit bestandener Reifeprüfung verließ. Nach meinem Wehrdienst begann ich in München im Wintersemester 1952 mit meinem Medizinstudium, das ich am 26. März 1959 mit dem Staatsexamen abschloß. Seit 15. Mai 1959 bin ich im Kreis-krankenhaus Haag in Oberbayern als Medizinalassistent tätig.

Ardishir Shahbandari